多重 PCR 法区分枣园两种菱纹叶蝉及检测其体内枣疯病植原体

郝少东[1,#], 陈昱圻[1,#], 王进忠[1,*], 王　合[2], 陶万强[2],
张志勇[1], 石小玉[1], 周　赛[1]

(1. 北京农学院植物科学技术学院, 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206; 2. 北京市林业保护站, 北京 100029)

摘要:【目的】目前发现,北京枣园中的凹缘菱纹叶蝉 *Hishimonus sellatus* (Uhler) 和片突菱纹叶蝉 *Hishimonus lamellatus* Cai 混同发生。已知凹缘菱纹叶蝉可以传播枣疯病,而片突菱纹叶蝉是否携带枣疯病植原体尚待证明。正确鉴别区分枣园中菱纹叶蝉的种类并测定其体内感染枣疯病植原体情况有助于阐明田间枣疯病的流行规律,从而提出有效的预防枣疯病及其媒介昆虫措施显得十分重要。传统形态学鉴定两种菱纹叶蝉种类的方法局限于雄性成虫外生殖器,本研究目的在于建立一种快速的分子生物学方法,在区分枣园中两种枣菱纹叶蝉的同时,可检测虫体内的枣疯病植原体。【方法】以凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉的 COI 基因以及枣疯病植原体的 16S rDNA 为扩增目标,分别设计引物,建立一种包含 3 对引物的多重 PCR 体系。测试该多重 PCR 体系对叶蝉总 DNA 的灵敏度、准确性,以及当两种叶蝉 DNA 同时存在时的辨别能力和对枣疯病植原体 16S rDNA 的灵敏度。【结果】该多重 PCR 可以准确区分凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉,并对虫体内枣疯病植原体实现检测,其对昆虫总 DNA 的灵敏度达到 0.012 ng,对枣疯病植原体 16S rDNA 模板的灵敏度达到 900 拷贝。【结论】该方法极大方便了对枣菱纹叶蝉的田间种群发生动态及虫体中枣疯病植原体感染的监测。

关键词: 凹缘菱纹叶蝉; 片突菱纹叶蝉; 枣疯病; 植原体; 多重 PCR; 分子鉴定

中图分类号: Q965.8　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2015)03-0264-07

Multiplex-PCR for identification of two *Hishimonus* species (Hemiptera: Cicadellidae) in jujube orchards and detection of jujube witches' broom (JWB) phytoplasma in their bodies

HAO Shao-Dong[1,#], CHEN Yu-Qi[1,#], WANG Jin-Zhong[1,*], WANG He[2], TAO Wan-Qiang[2], ZHANG Zhi-Yong[1], SHI Xiao-Yu[1], ZHOU Sai[1] (1. Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Beijing Forest Protection Station, Beijing 100029, China)

Abstract:【Aim】*Hishimonus sellatus* (Uhler) transmits jujube witches' broom (JWB). Currently, the *Hishimonus* leafhoppers occurring in jujube orchards are a mixed population of *H. sellatus* and *H. lamellatus* Cai. The latter is now suspected to be a JWB vector. As such, correct identification of *Hishimonus* species present in jujube orchards is essential for epidemiological surveys. However, the traditional identification of *Hishimonus* species by morphology is limited to the external genitalia of male adults. This study aims to develop and validate a rapid and inexpensive molecular method to discriminate between *H. sellatus* and *H. lamellatus* occurring in jujube orchards and to detect JWB phytoplasma in their bodies meantime.【Methods】A multiplex PCR method was designed for identification of two species and detection of JWB phytoplasma in their bodies. Three sequences, *i. e.*, 16S rDNA of JWB

基金项目: 国家林业局项目(201103); 国家自然科学基金项目(31272099); 北京市教委科技创新平台项目(PXM2008_014207_055164); 北京市教委科研基地建设害虫综合防治创新平台建设项目(PXM2013-014207-000044); 北京市高校人才强教计划项目(PHR-201107135); 国家科技支撑计划项目(2012BAD19B06); 北京农学院研究生改革与发展项目-研究生创新科研项目基金

作者简介: 郝少东, 男, 1987 年 12 月生, 内蒙古乌兰察布市人, 科研助理, 研究方向为媒介昆虫与植物病原互作, E-mail: haosd@bua.edu.cn; 陈昱圻, 女, 1986 年 11 月生, 黑龙江大兴安岭人, 硕士研究生, 研究方向为媒介昆虫与植物病原互作, E-mail: chenqiberg@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: jinzhw9276@163.com

收稿日期 Received: 2014-10-21; 接受日期 Accepted: 2015-02-12

phytoplasma, and COI genes of both *H. sellatus* and *H. lamellatus*, were used as the amplification targets. After preliminarily testing the PCR result, we further tested the accuracy and sensitivity of this multiplex PCR method to the total DNA solutions of *H. sellatus* and *H. lamellatus*. We also tested the sensitivity of this method to 16S rDNA of JWB phytoplasma. 【Results】The results showed that the multiplex PCR method established in this study could identify species of *H. sellatus* and *H. lamellatus* accurately, and could detect JWB phytoplasma in *H. sellatus* or *H. lamellatus* sensitively. The detection limits of the total DNA of both leafhoppers were approximately 0.12 ng, and the sensitivity of the method to the JWB phytoplasma 16S rDNA template approximately reached 900 copies. The validation results with 48 field collections of male individuals pre-checked by morphological observation showed that there was no mismatch between multiplex PCR and morphological observation in all samples, indicating the 100% accuracy of the multiplex PCR for identification of *H. sellatu* and *H. lamellatus*. 【Conclusion】The new multiplex PCR method developed in this study is greatly helpful for monitoring the dynamics of *Hishimonus* species occurring in jujube orchards and the infection of JWB phytoplasma in their bodies.

Key words: *Hishmonus sellatus*; *Hishimonus lamellatus*; jujube witches' broom; phytoplasma; multiplex-PCR; molecular identification

凹缘菱纹叶蝉 *Hishimonus sellatus* (Uhler)广泛分布于我国各省,是我国枣疯病(jujube witches' broom, JWB)、桑矮缩病的重要媒介昆虫和传染源(陈子文等, 1984; 孙淑梅等, 1988)。在枣树上,凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉 *Hishimonus lamellatus* Cai 常混和发生(孙淑梅等, 1988; 蔡平和崔士英, 1995),但两种叶蝉的生物学特性及发生规律却迥然不同(蒯元章等, 1981; 孙淑梅等, 1988)。凹缘菱纹叶蝉可以传播枣疯病(La and Woo, 1980; 孙淑梅等, 1988),片突菱纹叶蝉的传病能力尚不清楚。目前区分菱纹叶蝉属种类的方法主要依靠雄性成虫外生殖器的形态(蔡平和崔士英, 1995; 李子忠和汪廉敏, 2004),如何区分雌成虫及若虫尚无依据,这给研究枣疯病的媒介昆虫种群动态及其传播病害规律枣疯病流行监测和带来了难度。

检测和监测介体昆虫体内的病原物对于研究媒介昆虫传播的植物病害的流行具有重要意义。枣疯病由一种植原体(phytoplasma)引起。植原体,原称为类菌原体(mycoplasma like organism, MLO),是一类尚不能人工培养,专性寄生于植物的韧皮部筛管系统的原核植物病原菌。目前,枣疯病植原体的检测主要采用 PCR 法或基于 PCR 的 RFLP(restriction fragment length polymorphism, 限制性内切酶片段长度多态性)以及 DNA 测序(Cha and Han, 2002; Jung *et al*., 2003; 杨海旭等, 2012)。

多重 PCR(multiplex polymerase chain reaction),也称复合 PCR,即在一个反应体系中加入两对以上引物,可同时扩增出多个核酸片段,其反应原理、反应试剂和操作过程与常规 PCR 相同。多重 PCR 既有单个 PCR 的特异性和敏感性,又较之快捷和经济,在引物和 PCR 反应条件的设计方面表现出很大的灵活性(黄留玉, 2010)。

为方便鉴定凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉两近缘种及检测其携带的枣疯病植原体,我们利用这两种枣菱纹叶蝉的线粒体 COI 基因序列分别设计了 1 对特异引物,同时设计了检测枣疯病的引物,建立一种包含 3 对引物的多重 PCR 体系。该 PCR 体系让区分叶蝉种类和检测媒介昆虫体内感染植原体一步到位,可用于调查枣树上两种菱纹叶蝉的种群动态及其感染病原状况,为进一步制定枣疯病媒介昆虫的防治策略提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

凹缘菱纹叶蝉、片突菱纹叶蝉均饲养于 25℃, 16L∶8D 的光照培养箱,酸枣实生苗作为寄主。人工饲养的叶蝉用于制备总 DNA 标准品。于 2013 年采自位于北京市昌平区的北京农学院枣园(116.31593°E, 40.09476°N)的成虫及若虫用于验证多重 PCR 的可靠性。

1.2 试剂及仪器

DNA Marker (DL2000),Taq DNA Polymerase 和 dNTPs 购自宝生物工程(大连)公司;微量样品基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;引物委托北京中科希林生物科技有限责任公司合成;其它生化试剂均为国产分析纯;G-Storm 自动热循环仪,由英国 GRI 公司制造;微量核酸定量仪

K5500，由北京凯奥科技发展有限公司制造。

1.3 枣菱纹叶蝉总 DNA 标准品的制备

5 头凹缘菱纹叶蝉或片突菱纹叶蝉经液氮冷冻、研磨后按照微量样品基因组提取试剂盒说明提取总 DNA；紫外分光光度法测量 DNA 原液浓度，将 DNA 溶液稀释至 160 ng/μL 作为标准品并将此标准品按 4 倍比例进行递减梯度稀释。

1.4 枣菱纹叶蝉总 DNA 的快速提取及形态学鉴定

采用 SDS 法单头提取采集自枣园的菱纹叶蝉的总 DNA，在核酸提取前首先将虫体尾部约 0.1 mm 的组织切下，用于形态学鉴定。剩余虫体在 1.5 mL 离心管中经研磨后加入 450 μL 65℃预热的 SDS 提取缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl pH 8，20 mmol/L EDTA，1.4 mol/L NaCl，1% SDS（w/v），1% PVP-40（w/v），1% β-巯基乙醇(v/v)和 2 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL）]溶液，混匀，65℃水浴加热 1 h，其间 2 次轻缓颠倒混匀。待冷却至室温后加入 5 μL RNase A 贮液(1 mg/mL)，室温下放置 20 min。加入 500 μL 氯仿(异戊醇(24∶1，v/v)，轻缓颠倒混匀溶液。13 000 r/min 离心 15 min 至分相，将上清液转移至干净的离心管中，加入 600 μL 异丙醇，放入 –20℃冰箱冷冻 30 min，12 000 r/min 离心 1 min。弃上清液，加入 600 μL 75% 乙醇，12 000 r/min 离心 1 min，弃上清液后除去残留的乙醇，待沉淀干燥后，DNA 沉淀溶解于 100 μL ddH_2O 中，分装后 –20℃保存备用。

1.5 枣疯病植原体检测基因模板 DNA 标准品的制备

采用 CTAB 法(Porebski *et al.*, 1997)提取枣疯病症状叶片、正常叶片的总 DNA，按照石小玉等(2014)的方法扩增枣疯病植原体 16 – 23S rDNA。

枣疯病 16 – 23S rDNA 的 PCR 产物连接 pMD18-T 载体后，转化至大肠杆菌 DH5α 后涂平板，挑取单克隆菌株，提取构建的质粒(命名为 pMD18T-*JWB16S*)。质粒经由 M13 + 和 M13 – 双向通用引物测序(委托北京中科希林生物科技有限责任公司)鉴定。经紫外分光光度法测量质粒原液浓度，按照 660 Da/bp 计算质粒双链 DNA 的分子量，将 9×10^8 拷贝/μL 的 pMD18T-*JWB16S* 作为枣疯病植原体检测基因的模板标准品，并按照 10 倍比例进行梯度稀释。

1.6 多重 PCR 引物设计

利用凹缘菱纹叶蝉及片突菱纹叶蝉的 COI 基因序列设计区分两种叶蝉的引物，利用枣疯病植原体 16S rDNA 序列设计检测该病原微生物的引物(表 1)。引物设计满足以下原则：1)多重 PCR 中，相邻大小的 PCR 产物均大于 100 bp，以利于在 0.8% ~1.5% 的琼脂糖凝胶电泳中分离和观察；2)所有引物的 Tm 值尽量相近，便于在相同的温度下退火；3)利用同源基因不同碱基差异设计的多对引物间，不形成嵌套(巢式)PCR 的条件。如设计针对凹缘菱纹叶蝉 COI 基因的引物位点分别在 300 和 800 nt 处，则针对片突菱纹叶蝉 COI 基因的引物位点不可同时在 300 ~ 800 nt 之间，以减少 PCR 过程中的非特异性反应；4)对于目标物种设计的特异性引物，3′端的 5 个碱基中至少有 3 个特异性碱基。设计两种昆虫 COI 基因的引物时，首先用 ClustalX2 软件进行序列多重比对，随后挑选序列差异较大的区域按照以上原则设计正反向引物，最后在 Primer Premier 5.0 中预测引物的 Tm 值、错配及二级结构，剔除评分过低的引物。JWB 植原体的引物直接在 Primer Premier 5.0 中设计。

表 1 多重 PCR 体系中使用的引物信息

Table 1 Summary of primers used in multiplex PCR

物种 Species	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	扩增长度(bp) Amplicon size	用途 Usage	基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank accession no.
凹缘菱纹叶蝉 *Hishmonus sellatus*	Hs-1	TGACTTCTCCCACCCTCAT	753	区分物种 Species identification	COI	KJ670491
	Hs-2	TAAACCTCCAAGCGTAAACAA				
片突菱纹叶蝉 *H. lamellatus*	Hl-1	GGGAGGAGACCCCATTCTATACCAG	388	区分物种 Species identification	COI	KJ670492
	Hl-2	AAGACCCCCAAGTGTGAATAG				
枣疯病植原体 JWB phytoplasma	F458	ATTTCAGTGCTTAACGCTGTC	542	检测病原体 Pathogen detection	16S rRNA	GU184180
	R1000	GCAGTCTCGCTAAAGTCCC				

1.7 多重 PCR 反应条件

PCR 体系体积为 15 μL，其中 5 U/μL Taq DNA Polymerase 0.1 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 1.2 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2.4 μL，10 μmol/L Hs-1 和 Hs-2 引物各 0.6 μL，10 μmol/L Hl-1，Hl-2，F458 和 R1000 引物各 0.3 μL，DNA 模板 0.3 μL，ddH_2O 8.9 μL；PCR 反应条件为：94℃预变性 5 min；94℃变性 40 s，50℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，共 40 个循环；72℃延伸 5 min。

2　结果

2.1　多重 PCR 对两种菱纹叶蝉的区分

利用该多重 PCR 扩增两种菱纹叶蝉的 COI 基因时，凹缘菱纹叶蝉可扩增出 753 bp 的片段，且在 388 bp 处无扩增产物；片突菱纹叶蝉可扩增出 388 bp 的片段，且在 753 bp 处无扩增产物(图 1)。

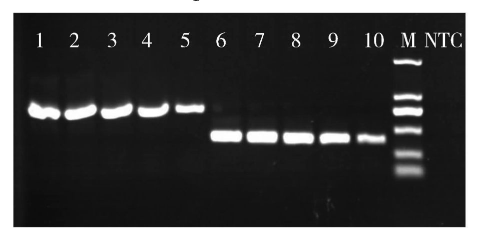


图 1　1% 琼脂糖电泳检测凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉 COI 基因的多重 PCR 的扩增产物

Fig. 1　PCR products of COI gene of *Hishmonus sellatus* and *H. lamellatus* amplified with the multiplex primer set detected on a 1% agarose gel

1 –5：凹缘菱纹叶蝉样品 Samples of *H. sellatus*；6 –10：片突菱纹叶蝉样品 Samples of *H. lamellatus*；NTC：无模板对照 No template control；M：DNA marker（DL2000）.

2.2　多重 PCR 反应对菱纹叶蝉总 DNA 的要求

2.2.1　菱纹叶蝉总 DNA 的检测灵敏度：如图 2(A)所示，凹缘菱纹叶蝉的，模板浓度分别为 $\frac{40}{4^0}$，$\frac{40}{4^1}$，$\frac{40}{4^2}$，$\frac{40}{4^3}$ 和 $\frac{40}{4^4}$ ng/μL 时，PCR 产物为清晰而单一的 753 bp 的条带；$\frac{40}{4^5}$ ng/μL 时，条带明显变暗；低于 $\frac{40}{4^5}$ ng/μL 时，条带不可分辨。

片突菱纹叶蝉的总 DNA 模板浓度在 $\frac{40}{4^0}$，$\frac{40}{4^1}$，$\frac{40}{4^2}$，$\frac{40}{4^3}$ 和 $\frac{40}{4^4}$ ng/μL 时，PCR 具有清晰而单一的 388 bp 的条带；$\frac{40}{4^5}$ ng/μL 时，条带明显变暗；低于 $\frac{40}{4^5}$ ng/μL 时，条带不可分辨。该 PCR 体系对两种菱纹叶蝉总 DNA 的灵敏度均达到 $\frac{40}{4^5}$ ng/μL × 0.3 μL≈0.012 ng。

当按照 1∶1 的浓度比例混合凹缘菱纹叶蝉与片突菱纹叶蝉的总DNA，并按4倍成等比稀释时，总

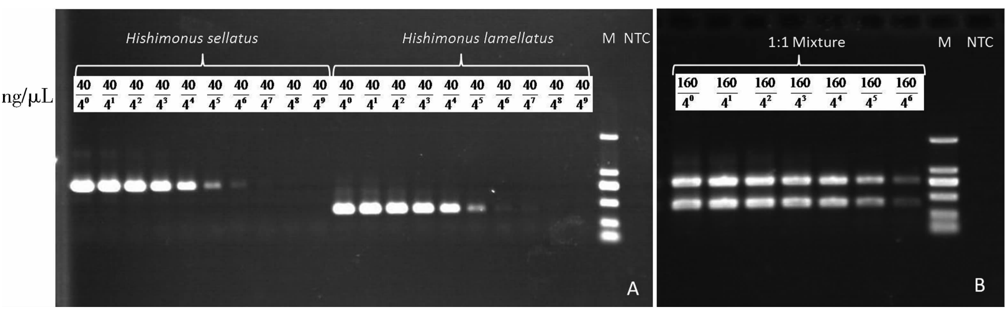


图 2　多重 PCR 反应对凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉 DNA 的灵敏度

Fig. 2　Sensitivity of multiplex PCR to total DNA solutions of *Hishmonus sellatus* and *H. lamellatus*

A：凹缘菱纹叶蝉、片突菱纹叶蝉各自按照 40 ng/μL 的 DNA 原液梯度稀释后的多重 PCR 产物 Multiplex-PCR products amplified with a gradient total DNA concentration of *H. sellatus* and *H. lamellatus*, respectively. M：DNA marker（DL2000）；NTC：无模板对照 No template control；B 将凹缘菱纹叶蝉、片突菱纹叶蝉 160 ng/μL 等量混合后进行梯度稀释后的多重 PCR 结果 Multiplex PCR products amplified with a gradient concentration of DNA equally mixed by total DNA of *H. sellatus* and *H. lamellatus*. M：DNA marker（DL2000）；NTC：无模板对照 No template control.

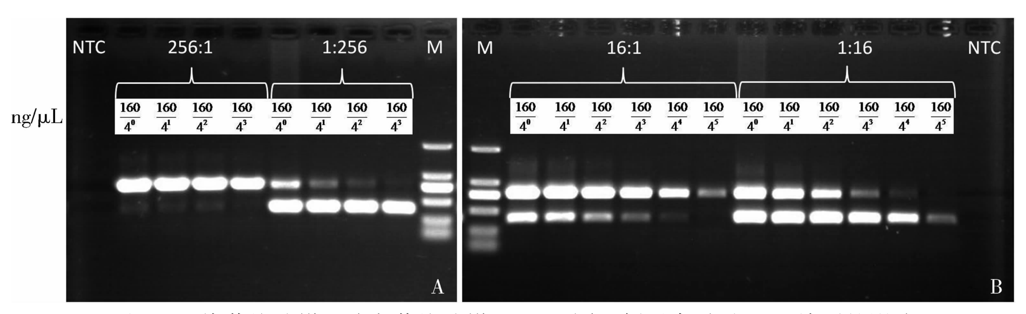


图 3　凹缘菱纹叶蝉和片突菱纹叶蝉 DNA 不同比例混合时对 PCR 检测的影响

Fig. 3　Effects of different mixing ratios of *Hishmonus sellatus* total DNA to *H. lamellatus* total DNA on multiplex PCR

A：凹缘菱纹叶蝉、片突菱纹叶蝉(4^4∶1 或 1∶4^4)不同 DNA 总浓度条件下的 PCR 结果 PCR results with mixed DNA template（*H. sellatus*∶*H. lamellatus* =4^4∶1 or 1∶4^4）. M：DNA marker（DL2000）；NTC：无模板对照 No template control；B：凹缘菱纹叶蝉、片突菱纹叶蝉(4^2∶1 或 1∶4^2)不同 DNA 总浓度下的 PCR 结果 PCR results with mixed DNA template（*H. sellatus*∶*H. lamellatus* =4^2∶1 or 1∶4^2）. M：DNA marker（DL2000）；NTC：无模板对照 No template control.

DNA 浓度从 160 ng/μL 变化至 $\frac{160}{4^6}$ ng/μL 过程中，同一 PCR 反应管中两对引物的扩增呈现相同的扩增效率(图 2：B)，与单独扩增单一模板(图 2：A)的扩增效率相差不大，两种产物电泳检测后始终呈现相同的亮度。

2.2.2 两种菱纹叶蝉的 DNA 交叉污染对多重 PCR 检测的影响：在分别以 256∶1，1∶256 混合的凹缘菱纹叶蝉与片突菱纹叶蝉的反应中，同一个 PCR 管的产物不同程度出现强弱两条带，其中当凹缘菱纹叶蝉∶片突菱纹叶蝉 DNA 混合比例为 256∶1 时，片突菱纹叶蝉的模板扩增(388 bp)受到抑制，扩增结果主要呈现为凹缘菱纹叶蝉的条带(753 bp)；当凹缘菱纹叶蝉∶片突菱纹叶蝉 DNA 混合比例为 1∶256 时，在高的总浓度模板下，表现为一条较亮的片突菱纹叶蝉的扩增条带及一条较弱的凹缘菱纹叶蝉条带(图 3：A)。16∶1 及 1∶16 混合两种叶蝉的 DNA 时，高模板浓度(≥ $\frac{160}{4^2}$ ng/μL)下较难分辨两种产物的区别，在模板浓度低于 $\frac{160}{4^3}$ ng/μL 时，表现为对主要模板的主要扩增及对次要模板的较少扩增，呈现出一明一暗两条带(图 3：B)。

2.3 多重 PCR 对枣疯病植原体检测的准确性和灵敏度

该多重 PCR 检测枣树叶片的总 DNA 时，枣疯病症状的叶片样品可以扩增出 542 bp 的产物，正常叶片的样品无扩增(图 4：A)，可见该 PCR 反应体系可以用于枣疯病植原体的检测。

该多重 PCR 检测 pMD18T-*JWB16S* 质粒标准品时，随着模板的梯度稀释，产物条带逐渐变细变浅，拷贝数到 90 时条带不可见(图 4：B)。该多重 PCR 体系对枣疯病植原体模板 DNA 的最小检出限为 900 拷贝数。该多重 PCR 体系较使用 P1/P7 引物对的 PCR 体系(Deng and Hiruki, 1991；Schneider *et al*., 1995)灵敏度度提高 100 倍(图 4：B, C)。

2.4 使用田间样品验证多重 PCR 鉴定叶蝉的准确性

对采集自北京农学院的 48 头雄性菱纹叶蝉进行多重 PCR 检测的结果显示(图 5)，其中 11 个样品扩增出 753 bp 的片段，为凹缘菱纹叶蝉，其他 37 个样品扩增出 388 bp 的片段，为片突菱纹叶蝉，该结果与形态学鉴定的结果完全一致。凹缘菱纹叶蝉中 34 和 35 样品中含有枣疯病植原体 DNA，扩增出 542 bp 的片段，阳性率 18%。片突菱纹叶蝉中 2，4，5，10，20，22 和 45 样品中含有枣疯病植原体 DNA，扩增出 542 bp 的片段，阳性率 19%。

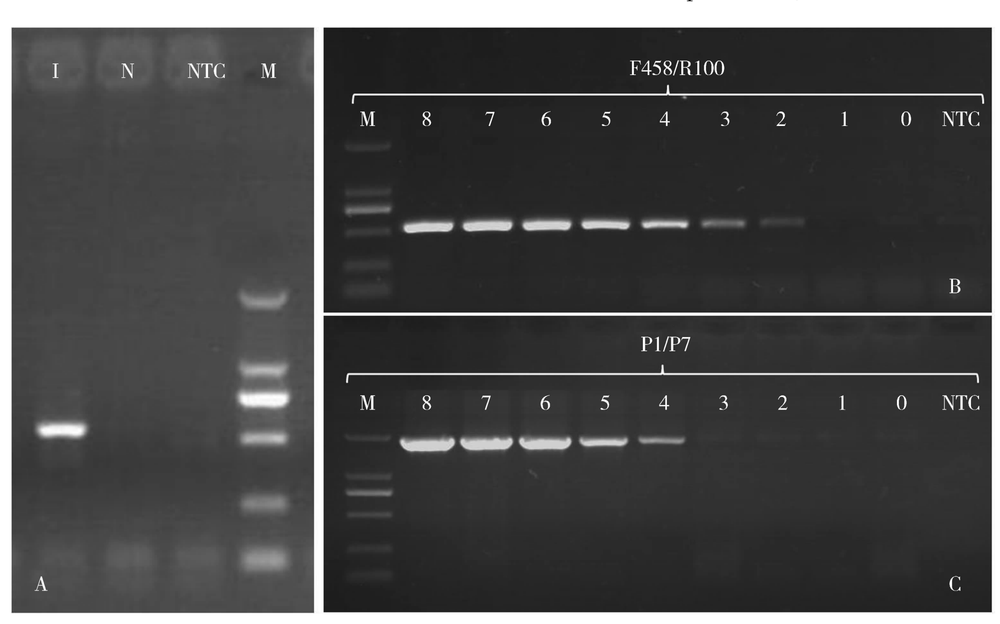


图 4 多重 PCR 对枣疯病植原体检测的准确性和灵敏度

Fig. 4 Accuracy and sensitivity of the multiplex PCR method for detecting JWB phytoplasma

A：多重 PCR 检测枣疯病植原体 Detection of JWB phytoplasma. N：正常枣树叶片 Normal jujube leaves; I：枣疯病树叶片 JWB-infected jujube leaves; NTC：无模板对照 No template control; M：DNA marker (DL2000). B, C：多重 PCR 检测 pMD18T-*JWB16S* 质粒时 F458/R1000 引物与其他 PCR 体系 P1/P7 引物的灵敏度对比 Comparison of the sensitivity between multiplex-PCR with primer set F458/R1000 and another PCR system with primer set P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al*., 1995). 0－8：质粒拷贝数分别为 9×10^0, 9×10^1, 9×10^2, 9×10^3, 9×10^4, 9×10^5, 9×10^6, 9×10^7 和 9×10^8 (Plasmid copies were 9×10^0, 9×10^1, 9×10^2, 9×10^3, 9×10^4, 9×10^5, 9×10^6, 9×10^7 and 9×10^8, respectively). M：DNA marker (DL2000); NTC：无模板对照 No template control.

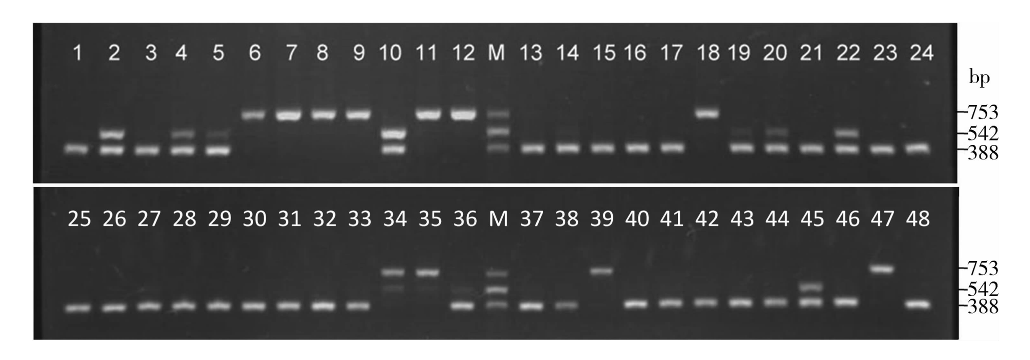


图 5　多重 PCR 对枣园中采集的菱纹叶蝉样品的使用验证

Fig. 5　Multiplex PCR assay results for samples of *Hishimonus* spp. collected from jujube orchards

1 – 48 ：不同样品 Different samples；M：DNA marker.

3　讨论

目前已有许多利用多重 PCR 对昆虫近似种鉴定实例(Vanlerberghe-Masutti, 1994; Fanello *et al*., 2002; Cywinska *et al*., 2006) ,也有人利用多重 PCR 进行植物病原体的检测或分型(张志宏等, 2006; 马以桂等, 2007; 岳红妮等, 2008; 张显勇等, 2008) ,但利用多重 PCR 同时进行物种鉴定和病原微生物检测的例子少见。本实验充分利用多重 PCR 可以添加多对引物,可同时扩增出多个核酸片段的特点,建立了一种多重 PCR 方法,在区分两种枣菱纹叶蝉的同时检测虫体内的枣疯病植原体。

利用 PCR 技术在对小体型昆虫进行物种鉴定或对微生物检测时,易受单头昆虫提取的 DNA 浓度及质量的影响(温硕洋和何晓芳, 2004) 。尤其在规模化 DNA 提取时,为了提高效率,常会在一定程度上牺牲 DNA 提取质量,以减少操作步骤,采用耗时更少的方法,这就要求后续的 PCR 反应有足够的灵敏度和抗干扰能力,保证实验的稳定性。我们在监测两种菱纹叶蝉的发生动态时,由于处理的样品量大,常会在分装或整理样品时有断足、错装或组织液污染的情况,最终导致 PCR 结果不理想。对此,我们在优化该多重 PCR 方法时考察了 DNA 交叉污染对多重 PCR 检测的影响,确保了在低程度污染时,不受污染 DNA 的影响仍然可以得到正确的实验结果。同时,建立的方法具有低至 0.012 ng 菱纹叶蝉总 DNA 的灵敏度,使得在应用于田间样品的验证时,成功率高达 100% 。

利用植原体通用引物对 P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al*., 1995) 的 PCR 是广泛引用于枣疯病植原体检测的方法,目前绝大多数对枣树叶片或韧皮部的枣疯病病原体的检测均利用该方法进行(杨海旭等, 2012) 。检测枣菱纹叶蝉时,考虑到虫体较小,提取的核酸浓度低,在保证特异性的前提下,我们重新设计了检测引物以满足多重 PCR 的需要,从而提高检测灵敏度。

在植原体介体昆虫的研究中,近缘种混合发生的情况会给生物学研究的初期造成很多麻烦(Tedeschi *et al*., 2009; Bertin *et al*., 2010) 。随着昆虫 DNA 条形码技术的发展(Schindel and Miller, 2005) 、植原体检测技术的不断更新(侯立华等, 2010) ,以及 PCR 技术的大量应用,使得在分子水平对介体昆虫和植原体进行检测成为可能。通过通用或特异性引物扩增、电泳检验,快速便捷。多重 PCR 又进一步集成了多次 PCR 反应,让检测更加快速、经济。

总之,本文建立了一种既可区分枣园发生的菱纹叶蝉种类,又可检测其虫体内枣疯病植原体的准确、简便、快速的多重 PCR 鉴定方法,极大方便了进一步研究枣菱纹叶蝉田间种群动态和枣疯病的传播规律。

参考文献 (References)

Bertin S, Picciau L, Ács Z, Alma A, Bosco D, 2010. Molecular differentiation of four *Reptalus* species (Hemiptera: Cixiidae) . *Bulletin of Entomological Research*, 100(05) : 551 – 558.

Cai P, Cui SY, Kuoh CL, 1995. A new species of *Hishimonus* in jurious to *Zizyphus Jujuba* (Homoptera: Cicadellidae, Euscelinae) . *Acta Entomologica Sinica*, 38(2) : 217 – 219. [蔡平, 崔士英, 葛钟麟, 1995. 为害枣树—菱纹叶蝉新种. 昆虫学报, 38(2) : 217 – 219]

Cha B, Han S, 2002. Genetic similarity between jujube witches' broom and mulberry dwarf phytoplasmas transmitted by *Hishimonus sellatus* Uhler. *The Plant Pathology Journal*, 18(2) : 98 – 101.

Chen ZW, Zhang FW, Tian XD, Zhang JQ, Wang QK, Shi CL, Ma JC, 1984. On the transimission of jujube witches' broom disease. *Acta Phytopathologica Sinica*, 14(3) : 141 – 146. [陈子文, 张凤舞,

田旭东，张金歧，王祈楷，史春霖，马俊才，1984. 枣疯病传病途径的研究. 植物病理学报，14(3)：141-146]

Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN, 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4): 413-424.

Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14(1): 53-61.

Fanello C, Santolamazza F, Della Torre A, 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. *Medical and Veterinary Entomology*, 16(4): 461-464.

Hou LH, Huang X, Zhu SF, 2010. The quantitative detection method of jujube witches' broom by real-time PCR. *Letters in Biotechnology*, 21(1): 70-72, 85. [侯立华，黄新，朱水芳，2010. 枣疯病植原体实时荧光定量 PCR 检测方法的研究. 生物技术通讯，21(1)：70-72，85]

Huang LY, 2010. Currrent PCR Technology: Fundamentals, Methods and Applications. 2nd ed. Chemical Industry Press, Beijing. 312. [黄留玉，2010. PCR 最新技术原理、方法及应用(第 2 版). 北京：化学工业出版社. 312]

Jung HY, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, Oshima K, Miyata S, Ugaki M, Hibi T, Namba S, 2003. '*Candidatus* Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4): 1037-1041.

Kuai YZ, Tang S, Deng XR, Tian LD, Tang YX, 1981. Studies on the Rhembis leafhoppers - *Hishimonus sellatus* and *Hishimonoides sellatiformis* pests of the mulberry. *Acta Phytopathologica Sinica*, 8(1): 1-8. [蒯元章，汤素，邓秀蓉，田立道，唐以巡，1981. 桑菱纹叶蝉的研究. 植物保护学报，8(1)：1-8]

La Y, Woo KS, 1980. Transmission of jujube witches' broom mycoplasma by the leafhopper *Hishimonus sellatus* Uhler. *Journal of Korean Forestry Society*, 48: 29-39.

Li ZZ, Wang LM, 2004. Notes on Chinese species of *Hishimonus* with descriptions of two new species (Homoptera, Cicadellidae, Euscelinae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 29(3): 486-490. [李子忠，汪廉敏，2004. 菱纹叶蝉属中国种类记要(同翅目，叶蝉科，殃叶蝉亚科). 动物分类学报，29(3)：486-490]

Ma YG, Wang JC, Xie H, Zhou CN, Du Y, Huang GM, Li FR, 2007. Multiple-PCR detection on three species of *Anguina* genus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 36(6): 508-511. [马以桂，王金成，谢辉，周春娜，杜宇，黄国明，李芳荣，2007. 3 种粒线虫多重 PCR 检测方法. 植物病理学报，36(6)：508-511]

Porebski S, Bailey LG, Baum BR, 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1): 8-15.

Schindel DE, Miller SE, 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038): 17-17.

Schneider B, Seemüller E, Smart CD, Kirkpatrick BC, 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG eds. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. Academic Press, San Diego, CA. 369-380.

Shi XY, Hao SD, Wang H, Tao WQ, Yang BD, Zhang ZY, Xue Z, Sun SL, Wang JZ, 2014. Studies on migration characters of jujube witches' broom phytoplasma into newborn tissues of jujube after overwinter. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 29(3): 56-60. [石小玉，郝少东，王合，陶万强，杨宝东，张志勇，薛正，孙淑玲，王进忠，2014. 枣疯病植原体越冬后向枣树不同类型新生组织转移特性研究. 北京农学院学报，29(3)：56-60]

Sun SM, Zhang FW, Tian XD, 1988. Studies on the biology and control of *Hishimonus sellatus* Uhler a vector of jujube witches'-broom disease. *Acta Phytopathologica Sinica*, 15(3): 173-177. [孙淑梅，张凤舞，田旭东，1988. 枣疯病的媒介昆虫——凹缘菱纹叶蝉生物学和防治研究. 植物保护学报，15(3)：173-177]

Tedeschi R, Lauterer P, Brusetti L, Tota F, Alma A, 2009. Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 123(3): 301-310.

Vanlerberghe-Masutti F, 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, 3(4): 229-237.

Wen SY, He XF, 2004. A method of rapid preparation of trace-DNA templates of insects for PCR. *Entomological Knowledge*, 40(3): 276-279. [温硕洋，何晓芳，2004. 一种适用于昆虫痕量 DNA 模板制备的方法. 昆虫知识，40(3)：276-279]

Yang HX, Wang Y, Zhao YL, Zhao J, Liu MJ, 2012. Molecular classification of jujube witches' broom (JWB) associated phytoplasma from *Ziziphus jujuba* Mill. 'Zanhuangdazao'. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(21): 4429-4437. [杨海旭，王洋，赵彦標，赵锦，刘孟军，2012. 赞皇大枣枣疯病植原体分子分类. 中国农业科学，44(21)：4429-4437]

Yue HN, Wu YF, Li YR, Wei T, Hou W, Wu KK, 2008. Simultaneous detection of three wheat virus BSMV, BYDV-PAV, WYMV and WBD phytoplasma by multiplex PCR. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(9): 2663-2669. [岳红妮，吴云锋，李毅然，魏婷，侯伟，武科科，2008. 小麦 3 种病毒病 BSMV, BYDV-PAV, WYMV 及 WBD 植原体病害的多重 PCR 同步检测. 中国农业科学，41(9)：2663-2669]

Zhang XY, Cai WW, Yang BP, Zhang SZ, Wang YQ, 2008. Development of a multiplex PCR protocal for the detection of SCMV and *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli*, lxx, the causal bacterium of sugarcane RSD. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(12): 4321-4327. [张显勇，蔡文伟，杨本鹏，张树珍，王业桥，2008. 甘蔗花叶病和宿根矮化病多重 PCR 检测方法的建立. 中国农业科学，41(12)：4321-4327]

Zhang ZH, Yang HY, Dai HY, Li H, Xiao M, 2006. Detection of strawberry mottle virus and strawberry mild yellow edge virus by multiplex RT-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*, 33(3): 507-510. [张志宏，杨洪一，代红艳，李贺，肖敏，2006. 应用多重 RT-PCR 检测草莓斑驳病毒和草莓轻型黄边病毒. 园艺学报，33(3)：507-510]

（责任编辑：袁德成）